

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620100153873

UDC _____

厦门大学

博 士 学 位 论 文

**抗寄生虫药物 ivermectin 作为 FXR
独特配体调节代谢**

**The antiparasitic drug ivermectin as a unique FXR ligand
regulates metabolism**

冯需辉

指导教师姓名: 李 勇 教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2013 年 10 月

论文答辩时间: 2013 年 11 月

学位授予日期: 2013 年 12 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

通过高通量药物库的筛选，我们揭示了一种抗寄生虫药物 ivermectin 能够特异性地与核受体法尼醇受体 (FXR) 结合，调节 FXR 与辅因子的结合并通过 FXR 参与代谢的调节。Ivermectin 与 FXR 结合，诱导 FXR 募集辅激活因子，这与 FXR 的完全激活剂 GW4064 是一致的，但诱导募集辅激活因子的能力较 GW4064 弱；然而，我们惊奇地发现 ivermectin 与 FXR 结合后，在一定的程度上能够诱导 FXR 募集辅抑制因子，例如 SMRT 和 NCoR，这与 GW4064 是不同的，这表明 ivermectin 能够调节 FXR 募集辅抑制因子的能力。Ivermectin 和 FXR LBD 复合物晶体结构显示 ivermectin 结合于 FXR 的配体结合口袋内，呈现独特的结合模式，主要表现为高度动态的 AF-2 螺旋和扩大的配体结合口袋。与 GW4064/FXR LBD 复合物相比较，ivermectin 的结合导致 Helix 2 和 Helix 6 向外偏移；复合物晶体结构和点突变实验证明 ivermectin 和 GW4064 与 FXR LBD 结合的结构机制在很大程度上是不相同的。在小鼠体内试验中，我们利用野生型和 FXR 敲除小鼠模型，发现 ivermectin 能够降低野生型小鼠血清中葡萄糖和胆固醇的水平，但对 FXR 敲除鼠没有明显的影响，这表明 ivermectin 对于小鼠体内代谢的调节是直接依赖于 FXR 的。在糖尿病模型小鼠 KK-A^y 中，与 FXR 激动剂 GW4064 相比较，ivermectin 能够更好地改善高血糖症状并提高胰岛素的敏感性，同时在一定程度上抑制高脂喂食诱导的小鼠体重增加，表明 ivermectin 作为 FXR 的配体在调节糖稳态和体重方面要优于 GW4064。鉴于 ivermectin 作为一种抗寄生虫药物已经广泛用于临床治疗，我们的发现显示 ivermectin 可以为以 FXR 为靶标的潜在安全治疗性药物的设计提供模板。同时，我们的研究也为“旧药”的新功能探索提供强有力的筛选策略。

关键词：法尼醇受体；Ivermectin；蛋白结构；代谢

ABSTRACT

We report here the identification of ivermectin, an antiparasitic drug, as an unexpected ligand for nuclear receptor FXR by high-throughput compound library screening, thereby uncovering the first mammalian target protein of ivermectin with high selectivity. Ivermectin regulates the transcriptional activity of FXR with distinctive properties in modulating coregulator recruitment. Ivermectin enhanced the interaction of FXR with various coactivator LXXLL motifs from the family of steroid receptor coactivators (SRC1-2, SRC2-3 and SRC3-3), with a less extent than that of GW4064. To our surprise, ivermectin also induced the recruitment of corepressor SMART2 and NcoR-2 by FXR, which is distinct from GW4064. The selective usage of coregulators may contribute to the unique characteristics of ivermectin in modulating FXR activity in metabolism.

Crystal structure of ivermectin complexed with the ligand binding domain (LBD) of FXR reveals the unique binding modes of ivermectin in the FXR ligand-binding pocket, including the highly dynamic AF-2 helix and an expanded ligand binding pocket. Superposition of structures of FXR/ivermectin and FXR/GW4064 revealed that both ligand-bound FXR LBDs aligned well with ligands occupying the similar space in the FXR pocket, but helix 2 and helix 6 were shifted outward and also distorted to make extra space to accommodate the larger size of ivermectin, resulting in the substantial expansion of the pocket size in comparison with GW4064-bound FXR LBD. Mutagenic analyses showed distinct results on the activation of FXR by ivermectin and GW4064, highlighting the differential roles of FXR pocket residues in recognizing various ligands.

Treatment of wild-type mice, but not FXR-null mice, with ivermectin decreases serum glucose and cholesterol levels, suggesting that ivermectin regulates metabolism by directly targeting FXR, and ivermectin is preferable in improving hyperglycemia and inhibiting body weight gain in diabetes mice of KK- A^y compared with GW4064. Our results suggest that ivermectin as a novel FXR ligand may possess advantages over GW4064 in regulating glucose homeostasis and body weight gain. Considering

that ivermectin is already a clinical drug approved by the FDA, our findings reveal an alternative template for design of FXR ligands with therapeutic potentials to rapid clinical applications by providing a safe lead compound. Moreover, given the fact that the molecular targets of many FDA drugs are still not clear, our study also validates a powerful screening strategy for the search of novel lead compounds for nuclear receptors as well as other molecular targets based on existing drugs, which also opens up many potentials for old drugs.

Key words: FXR; Ivermectin; Protein structure; Metabolism

目录

摘 要.....	V
ABSTRACT.....	VI
目录.....	VIII
Contents.....	XI
1 前言	1
1.1 Ivermectin	1
1.1.1 Ivermectin 介绍	1
1.1.2 Ivermectin 和盘尾丝虫病	2
1.1.3 Ivermectin 抗寄生虫机制	5
1.1.4 Ivermectin 与炎症反应	10
1.2 核受体	10
1.2.1 关于核受体.....	10
1.2.2 核受体的功能域.....	12
1.2.3 核受体 LBD 结构和功能	14
1.2.4 核受体 LBD 的大小和形状	15
1.2.5 核受体 LBD 的可塑性	16
1.2.6 核受体的结构决定辅因子的募集.....	18
1.3 FXR	19
1.3.1 FXR 研究进展	19
1.3.2 FXR 配体	19
1.3.3 FXR 与胆酸代谢	20
1.3.4 FXR 与脂类代谢	22
1.3.5 FXR 与糖代谢	22
1.3.6 FXR 与肝脏再生	24
1.3.7 FXR 与肝癌	25
1.4 结构生物学	26

1.4.1	蛋白质晶体研究进展.....	27
1.4.2	上海光源.....	29
1.4.3	蛋白结构与药物设计.....	30
1.4.4	蛋白质结构解析.....	31
1.5	本研究依据和思路	32
2	材料与amp;方法.....	35
2.1	常用药品和试剂	35
2.2	分子克隆	35
2.2.1	相关载体.....	35
2.2.2	感受态制备.....	37
2.2.3	载体构建.....	38
2.3	FXR LBD 蛋白表达与纯化	41
2.3.1	FXR LBD 蛋白表达	41
2.3.2	FXR LBD 蛋白纯化	41
2.4	蛋白结晶和数据采集	43
2.4.1	结晶前准备.....	43
2.4.2	蛋白结晶与晶体收集.....	43
2.4.3	晶体衍射和数据收集.....	43
2.5	蛋白晶体结构解析	44
2.6	辅因子结合实验	44
2.7	瞬时转染实验	45
2.8	报告基因分析	46
2.9	小鼠实验	46
2.9.1	小鼠处理.....	46
2.9.2	小鼠的材料收集和保存.....	46
2.9.3	小鼠血清的分离.....	47
2.9.4	小鼠血清成分的测定.....	47
2.9.5	葡萄糖耐受实验（GTT）	51
2.9.6	胰岛素敏感实验（ITT）	51
2.9.7	肝脏中 mRNA 提取	52

2.10 Real time PCR	52
2.10.1 mRNA 的反转录	52
2.10.2 Real time 的引物设计	53
2.10.3 Real time 的操作流程	54
2.10.4 Real time 的数据处理	54
2.11 肝脏组织 HE 染色	55
3. 结果	57
3.1 鉴定 ivermectin 作为 FXR 的特异性配体	57
3.1.1 相关配体的化学结构	57
3.1.2 Ivermectin 能够和 FXR 的 LBD 相互作用	57
3.1.3 Ivermectin 能够特异性地激活 FXR 转录活性	61
3.2 Ivermectin 介导糖类和脂类的代谢	62
3.2.1 Ivermectin 通过 FXR 介导调节糖类和脂类的代谢	62
3.2.2 Ivermectin 对于小鼠肝脏的影响	65
3.2.3 Ivermectin 降低 KK-A ^y 小鼠血清中糖和胆固醇水平	66
3.3 FXR/Ivermectin 复合物晶体结构	69
3.3.1 FXR/ivermectin/NCoR2 复合物晶体结构	69
3.3.2 FXR/ivermectin 和 FXR/GW4064 复合物结构对比	72
3.3.3 Ivermectin 和 GW4064 与 FXR LBD 相互作用的分子机制	75
4. 讨论	80
4.1 Ivermectin 作为 FXR 新的特异性配体	80
4.2 FXR 配体与机体代谢调节	81
4.3 Ivermectin 诱导 FXR LBD 构象变化	82
5. 结论	85
致谢	86
参考文献	87
附录	99

Contents

ABSTRACT(In Chinese).....	V
ABSTRACT(In English)	VI
Contents(In Chinese)	VIII
Contents(In English).....	XI
1 Introduce	1
1.1 Ivermectin.....	1
1.1.1 Ivermectin introduction.....	1
1.1.2 Ivermectin and onchocercosis.....	2
1.1.3 Mechanism of ivermectin anti-paracites.....	5
1.1.4 Ivermectin and inflammation.....	10
1.2 Nuclear receptor.....	10
1.2.1 About nuclear receptor.....	10
1.2.2 Functional domains of nuclear receptor.....	12
1.2.3 Structure and function of nuclear receptor LBD.....	14
1.2.4 The size and shape of nuclear receptor LBD	15
1.2.5 The plasticity of nuclear receptors LBD	16
1.2.6 The recruitment of coregulators determined by structure.....	18
1.3 FXR	19
1.3.1 Progress of FXR.....	19
1.3.2 FXR ligands	19
1.3.3 FXR and bile acids.....	20
1.3.4 FXR and lipids	22
1.3.5 FXR and glucose.....	22
1.3.6 FXR and liver regeneration.....	24
1.3.7 FXR and liver cancer	25

1.4	Structure biology.....	26
1.4.1	Progress of protein crystals	27
1.4.2	Shanghai Synchrotron Radiation Facility	29
1.4.3	Protein structure and drugs design	30
1.4.4	Protein structure determination	31
1.5	The basis and thinking of project	32
2	Materials and methods	35
2.1	Drug and reagents.....	35
2.2	Molecular cloning.....	35
2.2.1	Molecular cloning	35
2.2.2	Competent cell preparation	37
2.2.3	Vectors construction	38
2.3	Expression and purification of FXR-LBD.....	41
2.3.1	FXR LBD expression.....	41
2.3.2	FXR LBD purification	41
2.4	Protein crystalization and data collecting.....	43
2.4.1	Preparation for crystalization	43
2.4.2	Crystalization and cystals collecting	43
2.4.3	Crystals diffraction and data collecting	43
2.5	Protein structure determination	44
2.6	Cofactors binding assay.....	44
2.7	Transient transfection	45
2.8	Reports assay	46
2.9	Mice experiments	46
2.9.1	Mice treatemnt	46
2.9.2	Mice tissue collecting and stocking	46
2.9.3	Serum isolation	47
2.9.4	Serum parameters determination	47
2.9.5	Glucose torlerance tests	51
2.9.6	Insulin torlerance tests	51

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库